

Dizilim Teknolojisi: ‘Çip’lerden Sonsuzluğa

ARRAY TECHNOLOGY: FROM CHIPS TO ETERNITY

Dr.Hakan SAVLI^a

^aTıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, KOCAELİ

Özet

Dizilim teknolojisi son 10 yıl içinde büyük ilgi çeken bir alan oluşturmaktadır. ‘Gen-çipi’ bu teknolojinin sıklıkla kullanılan adı durumundadır. Metodolojisinin ana özelliği bir mikro-melezleştirme temelli ölçüm olmasıdır. Çip diye anılan filtre aslında bir tür membrandır ve bilinen gen bölgelerine ait kodların cDNA parçacıklarını temsil eden binlerce oligonükleotid noktacı içerir. Sonuçta elde edilen çip üstündeki melezleşme sinyali, floresan tarayıcılarla analiz edilir ve bilgisayar yazılımları aracılığıyla işlemden geçirilir.

Bu teknolojiyi birçok farklı amaç için kullanmak mümkündür. Bunlar arasında en göze çarpan kullanım alanı gen anlatımındaki farklılıkların ölçülmesidir. Ayrıca genotipleme ve sekans analizi içinde kullanılabilir. Elde edilen veriler ‘Gen-çip’ teknolojisinin yeni bir tıp çağını vaat ettiğine işaret etmektedir. Bu teknoloji mikroorganizmalar ve konakları arasında gerçekleşen iç ilişkilerin ardında yatan karmaşık genetik işleyişleri anlamamıza hız kazandıracak; böylece enfeksiyon hastalıklarının tanı, tedavi ve korunmasında gelişmelere yol açacaktır. Keza, ‘Gen-çip’ teknolojisi, gen fonksiyonlarına, hastalıkların fizyopatolojilerine, hastalık sınıflandırmalarına ve ilaç geliştirme çalışmalarına yeni bakış açıları getirecektir. Bu bakımdan, diabet, hipertansiyon, koroner kalp hastalıkları, astım, inflamatuvar barsak hastalıkları, kanser gibi hastalıklar ana hedeflerini temsil eder. Bu derlemede ‘Gen-çip’ teknolojisinin temelini oluşturan kuramlar ve analiz yöntemleri sunulmuş onkoloji, mikrobiyoloji, rutin tanı gibi alanlarda elde edilen veriler taranmış ve karşılaşılan teknik güçlükler kendi deneyimlerimiz ışığında tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Dizilim teknolojisi, rutin tanı, gen anlatımı

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24:534-540

Abstract

Array technology has become an area of great interest in the last decade. “Gene chip” is the commonly used name for this technology. The main characteristic of the methodology is a micro-hybridisation-based assay. A filter, called a chip, is a special kind of membrane in which are spotted several thousand oligonucleotides of cDNA fragments coding for known genes. The resulting hybridisation signal on the chip is analysed by a fluorescent scanner and processed with a special software package.

This technology can be used for many different purposes, most prominently to measure differential gene expression. In addition, it can be used for genotyping and sequencing analysis. Preliminary data indicates that “gene chip” technology may hold high promise and indeed usher in a new age of medicine. It will accelerate our understanding of the complex genetic processes underlying the interaction between microorganisms and the host, with consequent improvements in the diagnosis, treatment, and prevention of infectious diseases. It can also provide new insights into gene function, disease pathophysiology, disease classification and drug development. In this respect, diabetes, hypertension, coronary heart disease, asthma, inflammatory bowel disease, and cancer represent its main targets. In this review, the basic theory of microarray technology and its analytic methods are presented, recently obtained data are reviewed from fields such as oncology, microbiology, as well as in routine diagnostics, and technical issues are discussed in the light of our experience.

Key Words : Array technology, routine diagnostics, gene expression

Bilgisayar teknolojisinin moleküler biyolojiye paralel olarak hızla gelişmesi bu iki disiplini de birbirine yaklaştırdı. Sonuçta sağlık sektörü açısından heyecan veren sonuçlar doğdu. Bu heyecanı yaratan yeni gen teknolojileri

arasında en dikkat çekici olanı Mikro-dizilim (array) teknolojisidir. Bu yöntem, biyoteknolojinin de kavramsal olarak ulaşabileceği son noktalardan biridir. Günümüzde çoğunlukla gen anlatım analizlerinde kullanılmaktadır ve binlerce gen bölgesinin aynı anda incelenmesine imkan sağlamaktadır.

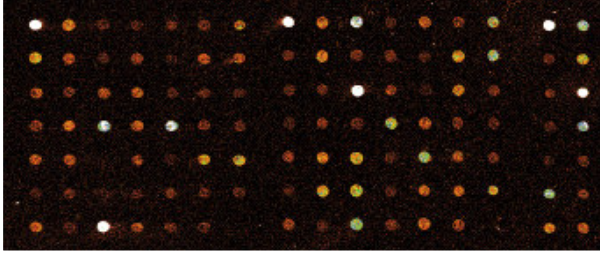
Bir zemin üzerinde sabitlenmiş sentetik gen dizileriyle serbest nükleik asitleri melezleştirme düşüncesi moleküler biyolojinin önemli adımlarından biriydi. Mikro dizilim incelemelerindeki amaç

Geliş Tarihi/Received: 21.11.2003 **Kabul Tarihi/Accepted:** 26.05.2004

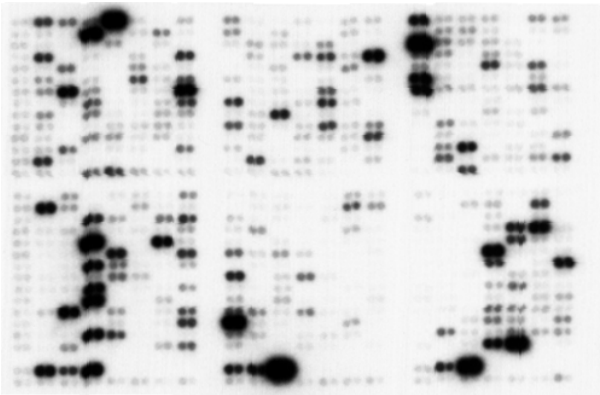
Yazışma Adresi/Correspondence: Dr.Hakan SAVLI
ODTÜ Sitesi, 327 Sok. No:27
Karakusunlar, Balgat, ANKARA
hakansavli@yahoo.com

ise bunu aynı anda binlerce gen bölgesinde gerçekleştirilmektir. Bu tekniğin ilk girişimleri Schena ve Shalon tarafından gerçekleştirilmiştir.^{1,2}

Dizilim teknolojisine ait adlandırmalara bakarken makro 'array' veya mikro 'array' olarak iki biçimde anıldığını görüyoruz. Mikro-dizilimler popüler bir tanımla gen-çipleri olarak da anılıyor. Bu farklılık dizilerin sabitlendiği zeminlerden kaynaklanmaktadır (Şekil 1). Makro-dizilimlerde kullanılan malzeme membranlardır ve bunlar genellikle nitrosellüloz naylon yapılıdır (Şekil 2). Mikro-dizilimler yani cam bazlı dizilimler mikroskobik lamlardadır ve daha küçük zeminlerde daha fazla sayıda gen içermektedir. 2002 yılında ulaşılan noktada, düşük yoğunluklu membranların kullanıldığı makro-dizilim formatlarının yüksek yoğunluklulara yani mikro-dizilimlere göre rutin kullanımının daha kolay olduğu söylenmekte-



Şekil 1. Mikro-dizilimlerin hazırlandığı cam yüzeylerin melezleştirme sonrası görünümü. Gen anlatım düzeylerine göre değişen floresan ışıklar izlenmektedir.



Şekil 2. Makro-dizilimlerin hazırlandığı naylon yüzeylerin melezleştirme sonrası görünümü. Gen anlatım düzeylerine göre değişen radyoaktif lekelenmeler izlenmektedir.

dir. Ayrıca makro-dizilimlerin daha yorumlanabilir ve düşük giderli olduğu izlenmektedir.³ Kişisel gözlemlerimiz de makro-dizilimlerin kullanım kolaylığını doğrular nitelikteydi.⁴ Bununla birlikte 2004 yılına doğru yüksek yoğunluklu mikro-dizilimler sayıca artmıştır ve yaşanan güçlükler azalmıştır.

Dizilim teknolojisinin 2004-2006 yılları arasında özel merkezlerde 2006-2010 yılları arasında da büyük hastanelerde tanı ve prognoz tayininde kullanıma gireceği söylenmektedir.⁵

Dizilim teknolojisinde kullanılan genlerin fabrikasyonu

Mikro-dizilimlerin yer aldığı zeminleri hazırlayan ilk ekip Brown ve arkadaşlarıncı oluşturulmuş ve sonra onlara başka ekipler de eklenmiştir (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown>). Bu genlerin fabrikasyonu amacıyla GenBank, UniGene gibi birçok veri kaynağına gidilmektedir. Dizilim yapımı bu kaynaklardan seçilen genlerin Polimerize Zincir Reaksiyonu (PZR) ürünlerinin (yaklaşık 0.6-2.4 kb) sabitlenmesiyle gerçekleşir. Bu sabitleme işlemi robotlarla yürütülür ve yaklaşık her bir noktacığa 100-500 µg/mL PZR ürünü sabitleştirilir. Bu oran mikro-dizilimlerde daha az miktarda kullanılan ürünle, santimetre kare başına 2500 noktacığa kadar artabilmektedir. Seçilmiş binlerce farklı hedef gen bölgesi solusyonlar içinden otomatik olarak seçilmekte ve mikroskopi lamaları slaytları üzerine püskürtülmektedir. Farklı firmaların kullandığı değişik sistemler bu püskürtmede kullanılan ürünün miktar ve hacim olarak farklılaşmasına yol açmaktadır. Ayrıca seçilen püskürtme yöntemi de ürünlerin melezleşme etkinliğini etkileyebilmektedir.^{3,5}

Dizilim deneylerinde lekeleme, melezleştirme ve tarama

Mikro-dizilim teknolojisinde bir mRNA örneğinin içinden haritalanmış anahtar bölgeler özgün nükleotidlerine fluoremer bitiştirilerek etiketlenmektedir. Naylon membran ya da cam lamalar bu etiketlenmiş karışımlarla melezleştirilmektedir. Analizin amacı örneğin bir gen anlatımına yönelikse, elde edilen sinyal yoğunluğu söz konusu genin

anlatım oranını verecektir. Sinyal yoğunluğundaki değişikliği ölçebilmek için test edilen örneğe ek olarak bir de referans olacak örnek kullanılmaktadır. Bu referans örnekteki gen anlatımı hedef alınan örneğin gen anlatımının artıp azalmadığı konusunda bir test örneği olmaktadır. Melezleştirmeler sonrasında her bir dizilimde oluşan farklı anlatımlar yüksek yoğunluktaki tarayıcılar aracılığıyla taranmaktadır. Oluşan reaksiyonunun farklılığına göre ortaya çıkan bilgi özel bilgisayar programlarıyla analiz edilerek görselleştirilmektedir.^{5,6}

Dizilim yönteminden kabaca üç biçimde yararlanılmaktadır

1. Mikro-dizilim kullanılarak gen ifade profilinin çıkarılması

RNA izolasyonu ile başlar. Bu izolasyon vücut sıvılarından, dokulardan ya da bakterilerden yapılabilir. Yaşayan bir dokuda aynı anda onbinlerce gen ifadesi mevcut bulunabilir. Böylece RNA'sı izole edildiği andaki ifade edilen tüm genlerinin dökümü yapılmış olur.¹⁰⁻¹³

2. Mikro-dizilim kullanılarak yapılan genotipleme

Kan ya da tükürük salgısından yıllardır yapılan polimerize zincir reaksiyonunun gelişmiş bir biçimidir. Binlerce şüpheli gen arasından saptanan genetik belirteçler sayesinde hem araştırmada hem de klinikte kullanılacak olan risk ölçümlerini saptamak mümkündür. İnsan genom projesinin sonuçlanmasıyla 2 milyon yeni tek nükleotid poliformizmi (SNPs) bölgesi tanımlanmıştır ve böylece yeni genetik belirteçler elde edilmiştir. Bu kaynakların kullanım potansiyeli çok geniş olup, çeşitli klinik çalışmaların önü açılmıştır. Bu hastalıklar arasında diyabet, hipertansiyon, koroner kalp hastalıkları, astım, inflamatuvar barsak hastalıkları, kanser bulunmaktadır.^{6,7} Mikro-dizilim yöntemiyle genotipleme yaparken 'tek nükleotid poliformizm çip'lerini kullanmak hastalığa ve ilaç yanıtlarına ait bu yeni belirteçlerin analizi imkanını sağlayacaktır. Bu çipler bize tek bir melezleştirmede 2000 polimorfik bölgeyi aynı anda analiz etme şansını verir.^{8,9} Böylece alınacak olan 'genetik parmak izleri' kişinin tek gen ya da çoklu gen hastalıkları-

na olan özel yatkınlıklarını belirleyebilecektir.

3. Mikro-dizilim kullanılarak yapılan dizi analizleri

Mikro-dizilim teknolojisi kandan izole edilen DNA'dan çoğaltılmış ürünlerde mutasyon analizleri yapılabilmesine olanak sağlar. Bu yöntem sayesinde aynı anda binlerce mutasyon taramasını ve tek gene bağlı ya da genetik olarak karmaşık hastalıkların moleküler tanısını yapabilmek mümkündür. Böylece mutant ya da polimorfik formlara ait bilgi çok zenginleşmektedir ve genom haritalama çalışmaları hızlanmaktadır.¹⁰⁻¹³

Dizilim Teknolojisinin Gen ekspresyonunda kullanımı

Tüm insan hücreleri 10 binlerce gen anlatımı içerir. Bu anlatımların düzeyleri hücre farklılaşması için anahtardır. Dizilim teknolojisi günümüzde ana olarak gen anlatım analizlerinde kullanılmaktadır ve binlerce cDNA'nın aynı anda analiz edilmesine imkan sağlamaktadır. Bir dizilim deneyinde RNA transkriptlerinin 3' ucundan türetilen spesifik genler bir zemin üzerine sabitlenmiştir. İncelenecek örneğin RNA parçaları floresan olarak işaretli cDNA problemlerine dönüştürüldükten sonra bu zemindeki gen bölgeleriyle melezleştirilir.² Böylece biyoinformatik ve istatistik bilimlerinin de yardımıyla geniş genom bölgelerinin taranmasına olanak sağlanmaktadır.¹⁴ İncelenen örnek ve referans örneklerde ortak bulunan ve aynı oranda anlatıma girmesi beklenen *housekeeping* gen bölgeleri bir internal kontrol olarak kullanılmaktadır ve sinyalin göreceli değişikliğinin standardize edilmesine olanak sağlamaktadır.

Dizilim teknolojisinin onkolojide kullanımı

Dizilim analizleri klinik amaçlı olarak da kullanılmaktadır. Kullanıma giren p53 ya da BRCA1 ve BRCA2 gibi onkogenlere yönelik dizilimler ticari olarak mevcuttur.^{15,16} Ayrıca bu teknoloji tümörlerin gen anlatım kalıplarına göre primer ya da sekonder olup olmadıklarını saptayabilir. Bu yolla tedavi şemaları ve risk ölçümü için kullanılabilir. Yine tümörlerin tedaviye yanıtları, prognoz tahminleri ve ilaç dirençliliğiyle olan iliş-

kileri de dizilim kökenli gen ifade incelemelerinin potansiyel uygulama alanları arasındadır. Onkolojide kullanılan tanısal amaçlı mikro-dizilim uygulamalarına örnek olarak akut myeloid lösemi ve akut lenfoid lösemili tabloları ayırt edebilmek için 6817 genin ayrımının yapıldığı bir çalışma verilebilir. Araştırmaya alınan 38 hastanın tamamına yakınında sonuçlar doğru olarak sınıflandırılmıştır. Yöntem ayrıca akut lösemilerin patogenezi için 50'ye yakın yeni olası genin saptanmasına da imkan sağlamıştır.¹⁷

Benzer çalışmalardan birinde yaygın B hücreli lenfomaya ait yeni prognostik alt gruplar tanımlanmıştır.¹⁸ Bu gibi çalışmalar melanomalarda, göğüs kanserlerinde, kolorektal kanserlerde de her geçen gün sayıları artarak gerçekleştirilmektedir.¹⁹⁻²²

Dizilime bağlı uygulanan Karşılaştırmalı Genomik Melezleştirme teknolojisi

Klasik bir KGM: Karşılaştırmalı Genomik Melezleştirme (Comparative Genomic Hybridisation) tekniğinde genomik kazanç ve kayıplar tek bir deneyde tümör DNA'sı ve normal kontrol DNA'sını karşılaştırarak elde edilir. Bu amaçla tümör DNA'ları normal metafaz kromozomlarıyla melezleştirilir.²³ Bu yöntem rutin sitogenetik laboratuvarlarının en göz alıcı uygulamalarındandır. Yeni gelişen bir yöntem olan mikro-dizilim- KGM'de ise normal metafaz kromozomlarının yerini aynı kromozomun birçok gen bölgesinin bulunduğu bir dizilim platformu alır. Böylece 5000 noktacıta yaklaşık 1 mb çözünmeye ulaşan genomik kayıp ve kazancı tarama olanağı doğar.²⁴ Yani başka bir deyişle Klasik KGM'nin laboratuvarlarda rutin tanıda kullanılmasındaki büyük bir engel olan çözünürlük problemi ortadan kalkar. Bugün çözüm bekleyen tek şey genomik denge değişikliklerinin incelemelerinin otomatize edildiği güvenilir çip formatlarına kavuşmaktır.

Dizilim teknolojisinin enfeksiyonda kullanımı

Dizilim yönteminin kullanılmasıyla *Mycobacterium tuberculosis*, *HIV* gibi patojenlerin genomlarındaki diziler ayrıntılarıyla belirlenebilir.

mektedir. Böylece antibiyotiklere dirençli genlerin varlığını belirlemek ya da viral alt grupları ayırt etmek mümkündür. Üstelik bunları 24 saatten daha az bir sürede, viral-bakteriyel kültürlerle gerek olmadan gerçekleştirmek mümkündür. Böylece klinikte daha etkili antibiyotik veya antiviral tedaviler uygulanabilir.^{25,26}

Özellikle son 2 yılda mikrobiyolojide bu teknolojinin kullanımı yaygınlaşmıştır. Örneğin HIV proteaz geni dizilerinde yapılan dizilim taramaları çok değişken bir mikroorganizma genomuyla karşı karşıya olduğunu ortaya koymuştur.²⁵ Yayınlanan yüzlerce çalışma arasında örneğin 'transcriptome' analizlerinin yapıldığı çalışmalar anılabilir. Bu yöntemle Gama herpesvirus ve *Neisseria meningitidis*'in enfeksiyon sırasındaki ifadesinde azalan ve artan gen bölgeleri binlerce gen arasından taranarak belirlenmiştir.^{27,28}

KGM teknolojisi ve silikon çiplerin kullanımıyla yapılan çok geniş ölçekli bir çalışmada *Streptococcus agalactiae*'nin 2.160.267 baz çiftli genomu taranmış; genetik heterojenite ve virulans gelişiminin evrimi açısından ilginç sonuçlara ulaşılmıştır.²⁹

Dizilim teknolojisinin rutin tanı ve tedavide kullanımı

Özgün mutasyonların tanısında kullanılan çeşitli oligonükleotid dizilim çipleriyle DiGeorge sendromu, Duchenne kas distrofisi hastalıklarının ayrıntılı tanısı bugün mümkündür. Mutasyon saptamada kansere yatkınlık bildiren BRCA1 ve p53 çipleri kullanıma giren ilk örneklerdir. Kişideki bu genlere ait muhtemel tüm mutasyonlar bu çipler sayesinde taranabilmektedir.³⁰ Daha sonradan derin ven trombozuyla ilgili olarak faktör V Leiden çipleri, Alzheimer hastalığına yatkınlığı aramada apolipoprotein E4 çipleri, Crohn hastalığıyla ilgili yeni tanımlanmış NOD2 genine ait çipler de kullanımdadır.³¹

Öte yandan tedavide kullanılan ajanlara karşı genetik anlatımda oluşan yanıtın ölçülmesiyle ilgili başlangıç çalışmaları da gerçekleştirilmiş durumdadır.^{32,33} Bilindiği gibi birçok ilaç 'sitokrom P450' alt yolu üzerinden metabolize olur. P450 genlerindeki polimorfizmleri analiz etmeye yara-

yan çipler bu yüzden kişilerin ilaçlara karşı gösterdiği iyi etki ve yan etkilerini incelemeye yaramaktadır. P450 çipleri Affymetrix tarafında pazarlanmaya başlamıştır. Genetik-farmakolojik ilişkilerinin birden fazla faktörden etkilendiği düşünüldüğünde bu tür çalışmalarda oluşturulan modellerin tek gen anlatımının çözümlenmesini hedeflemeyeceği açıktır.

Özellikle ilaç toksisitesine yol açan özel genlere ait bilgilerin dizilim çipleriyle taranarak dökümlenmesi çok değerli bir yaklaşımdır.^{34,35}

Mikro-dizilim yöntemiyle rutin tanıya yaklaşım çeşitlenerek genişlemektedir. Bunlar arasında kronik hepatitli ve hepatosellüler karsinomlu hastalarda yapılan analizler (Kaneko, 2003) ya da HLA tiplemesine yönelik çalışmalar da dikkat çekmektedir.³⁶ Kuşkusuz organ nakli açısından da ölçülemeyecek kadar önemli olan bu çalışmalar sonucu elde edilen ilk pozitif göstergeler heyecan vericidir.^{37,38}

Ayrıca kistik fibrozis veya ataxia telenjiectazi hastalıklarından sorumlu genlere yönelik oligonükleotid dizilim çipleri de düzenlenmiştir.^{39, 40}

Sonuç

Bu teknolojiyi uygulayacak yetişmiş insan gücündeki azlık uygulamaların toplumsallaşması önündeki en büyük engeldir. Üstelik farklı dizilim sistemleri arasında elde edilen bilginin standardize edilemesinin zorluğu, değişik disiplinler arası işbirliğinin zorunluluğu yaşadığımız sorunlardan bir kaçıdır.

Bir diğer önerilebilecek yaklaşım (ki bugün sıklıkla uygulanan bir yaklaşımdır) dizilim teknolojisiyle elde edilecek sonuçların rastgele seçilmiş diziler de nicesel PZR ile doğrulanmasıdır. Nicesel PZR bir başka yeni gelişen gen ifade teknolojisi olup duyarlılığı açısından çok yüksek bir teknolojidir ve duyarlılık alanı mikro ya da makro-dizilim teknolojilerinden daha geniştir. Buna ait izlenimimiz dizilim teknolojisiyle gerçekleştirdiğimiz çalışmalarımızın Nicesel PZR'ile doğrulanması sırasında elde edilmiştir.⁴ Bu çalışmalarımızda örneğin FLII genine ait nicesel PZR anlatım analizlerinde, dizilim analizlerine göre onbinlerce kat daha düşük

değerler saptanmıştır. Benzer şekilde gözlemleri olan ekipler de gerek klasik yöntemlere gerekse dizilim teknolojisine kıyasla nicesel PZR'ın yüksek duyarlılığına tanıklık etmektedir.⁴¹

1995'den bu yana önemli gelişmeler kaydetmekle birlikte yakın gelecekte daha düşük maliyetli ve yüksek yoğunluklu, uyarlanma yeteneği geniş dizilim çiplerine kavuşmayı bekliyoruz. Tüm doku gruplarının yer aldığı çiplerin transplantasyonda kullanımının ya da bilinen tüm onkogenlerin yer alacağı dizilimler ile onkolojik tanıya gidilmesinin de yakın gelecekte mümkün olacağını biliyoruz. Tüm genomun yüksek duyarlılıkla taranması mümkün olduğunda bugünkü sitogenetik laboratuvarları da yeniden şekillenecektir.^{39,40,42,43}

Bugün örneğin tanısal patolojiyi dramatik olarak değiştirecek bir fırsatla karşı karşıya olduğumuz bilincindeyiz. Yakın bir gelecekte belki yalnız tanı ve prognoz için yeni olanaklardan değil, histopatolojik sınıflandırmalarda da bir yeniden değerlendirmeden sözedeceğiz.⁴⁴

Günümüzde bir mikro-dizilim deneyinde aynı günde 48.000 geni analiz etmek mümkündür. Çok yakında insanda incelenecek tüm genetik bilginin tek bir çipe sığacağı varsayılmaktadır.⁴⁵ İlginç olan nokta patoloğun, mikrobiyoloğun ya da başka bir laboratuvar disiplinin atlanarak dizilim laboratuvarıyla klinisyen arasında bağımsız bir diyalogun doğup doğmayacağı sorusudur. Elimizdeki veriler bu yönde hızlı bir gelişime ve yeni bir tıp anlayışının doğumuna işaret ediyor. Teknolojinin etkileyici gelişimi üzerinde dikkatle düşünülmesi gerekmektedir. Tek çipe indirilmiş bir inceleme sistemiyle bireylerin tüm kalıtsal hastalıklarının ve sağlık açısından taşıdıkları kişisel risklerin bilinmesi mümkün olduğunda, bu onların yaşamını nasıl etkileyecektir? Bu bilgiler titizlikle korunmadığı takdirde, bireyler iş başvurularından özel yaşamlarına kadar bunların sonuçlarından nasıl etkilenecektir? Bu açılardan bakınca dizilim teknolojisinde de tıpkı klonlama veya kök hücre aktarım teknolojilerinde uygulananlara benzer yasal düzenlemelere ihtiyaç duyulabilir.⁴⁶

Teşekkür

Dizilim teknolojisini uygulama ve öğrenmeye olanak sağlayan Helsinki Üniversitesi Medikal Genetik Laboratuvarına ve Transplantasyon Laboratuvarını temsilen Dr. Seppo PAKKALA'ya teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(20):10614-9.
2. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270(5235):467-70.
3. Zamatteo N, Hamels S, De Longueville F, et al. New chips for molecular biology and diagnostics. *Biotechnol Annu Rev* 2002;8:85-101.
4. Savli H, Aalto Y, Nagy B, Knuutila S, Pakkala S. Gene expression analysis of 1,25(OH)2D3 dependent differentiation of HL-60 cells - a cDNA array study. *Br J Haem* 2002;118(4):1065-70.
5. Aitman TJ. DNA microarrays in medical practice *BMJ* 2001;323(7313):611-5.
6. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:(5507):1304-51.
7. Todd JA. Tackling common disease. *Nature* 2001; 411(6837):537-9.
8. Wang DG, Fan J-B, Siao C-J, Berno A, Young P, Sapolsky P, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998;280(5366):1077-82.
9. Fan J-B, Chen X, Halushka MK, Berno A, Huang X, Ryder T, et al. Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res* 2000;10(6):853-60.
10. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 1999; 21(Suppl 1):20-4. Review.
11. Gerhold D, Rushmore T, Caskey CT. DNA chips: Promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem Sci* 1999;24(5):168-73. Review.
12. Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. Making and reading microarrays. *Nat Genet* 1999;21(Suppl 1):15-9. Review.
13. Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(10):4913-8.
14. Bassett DE Jr, Eisen MB, Boguski MS. Gene expression informatics-it's all in your mine. *Nat Genet* 1999;21(Suppl 1):51-5. Review.
15. Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, et al. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(13):7382-7.
16. Sapolsky RJ, Hsie L, Berno A, Ghandour G, Mittmann M, Fan JB. High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays. *Genet Anal* 1999;14(5-6):187-92.
17. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286(5439):531-7.
18. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-11.
19. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 2000;411(6840):974.
20. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Sefror E, Handrix M, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000; 406(6795):536-40.
21. Perou CM, Serlie T, Eisen BB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-52.
22. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000;289(5482):1197-202.
23. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258(5083):818-21.
24. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20(2):207-11.
25. Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, et al. Extensive polymorphisms observed in the HIV-1 cladeB protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nature Med* 1996;2(7):753-9.
26. Gingeras TR, Ghandour G, Wang E, Berno A, Small PM, Drobniowski F, et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition of generic mycobacterium DNA arrays. *Genome Res* 1998;8(5):435-48.
27. Ebrahimi B, Dutia BM, Roberts KL, et al. Transcriptome profile of murine gammaherpesvirus-68 lytic infection. *J Gen Virol*. 2003;84(Pt 1):99-109.
28. Dietrich G, Kurz S, Hubner C, et al. Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* during infection. *J Bacteriol* 2003;185(1):155-64.
29. Tettelin H, Maignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, et al. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(19):12391-6.
30. Takahashi Y, Ishii Y, Nagata T, Ikarashi M, Ishikawa K, Asai S. Clinical application of oligonucleotide probe array for full-length gene sequencing of TP53 in colon cancer. *Oncology* 2003;64(1):54-60.

31. Ulrika Liljedahl. Microarray technology for genotyping in pharmacogenetics. Dissertation. University of Uppsala, 2004.p.24-5.
32. Editorial. To affinity . . . and beyond! *Nature Genet* 1996; 14: 367-70.
33. Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC, Afshari CA. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol Carcinog* 1999;24(3):153-9. Review.
34. Braxton S, Bedilion T. The integration of microarray information in the drug development process. *Curr Opin Biotechnol* 1998;9(6):643-9. Review.
35. Kaneko S, Kobayashi K. Clinical application of a DNA chip in the field of liver diseases. *J Gastroenterol* 2003;38 (Suppl 15):85-8.
36. Balazs I, Beekman J, Neuweiler J, Liu H, Watson E, Ray B. Molecular typing of HLA-A, -B, and DRB using a high throughput micro array format. *Hum Immunol* 2001; 62(8):850-7.
37. Haddock SH, Quartararo C, Cooley P, Dao DD. Low-resolution typing of HLA-DQA1 using DNA microarray. *Methods Mol Biol* 2001;170:201-10.
38. Guo Z, Hood L, Petersdorf EW. Oligonucleotide arrays for high resolution HLA typing. *Rev Immunogenet* 1999;1(2):220-30.
39. Hacia JG, Sun B, Hunt N, et al. Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays. *Genome Res* 1998; 8(12):1245-58.
40. Cronin MT, Fucini RV, Kim SM, Masino RS, Wespi RM, Miyada CG. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays. *Hum Mutat* 1996;7(3):244-55.
41. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* 2001;25(4):443-51.
42. Hacia JG, Brody LC, Chee MS, Fodor SP, Collins FS. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nat Genet* 1996;26(21):4975-82.
43. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, et al. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(24):15687-92.
44. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(16):9212-7.
45. Yeatman TJ. The future of clinical cancer management: one tumor, one chip. *M Surg* 2003;69(1):41-4.
46. Henn W. Genetic screening with the DNA chip: A new Pandora's box? *J Med Ethics* 1999;25(2):200-3.